

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 5 月 6 日 (06.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/037272 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/7024, 39/395, C07H 15/10 // A61P 31/12 (SUZUKI,Yasuo) [JP/JP]; 〒420-0911 静岡県 静岡市 瀬名 1 丁目 8 番 3-1 0 2 Shizuoka (JP). 左一八 (JWA,Ipal) [KR/JP]; 〒424-0857 静岡県 清水市 川原 町 2 1-1 1-4 0 2 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013486
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 22 日 (22.10.2003) (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA,Toshio); 〒107-0062 東京都 港区 南青山 6 丁目 11 番 1 号 スリーエフ南青山 ビルディング 7F Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): BR, CN, JP, MX, US, VN.
- (30) 優先権データ: 特願 2002-307232 2002 年 10 月 22 日 (22.10.2002) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 康夫

(54) Title: DENGUE VIRUS INFECTION INHIBITOR

(54) 発明の名称: デング熱ウィルス感染阻害剤

(57) Abstract: It is intended to provide a dengue virus infection inhibitor, as a drug effectively inhibiting the infection with dengue virus, which is characterized by at least containing as the active ingredient a carbohydrate molecule having as an essential constituent an oligosaccharide chain represented by the following general formula (I): Hex¹NAc β 1-3Hex² β 1-4Hex¹ β 1- (I) wherein Hex¹ and Hex² represent each hexose.

(57) 要約: デング熱ウィルスの感染を効果的に阻害する薬剤として、少なくとも、次式(I)Hex¹NAc β 1-3Hex² β 1-4Hex¹ β 1-(I)(ただし、Hex¹およびHex²はヘキソースを表す)で表されるオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤を提供する。

WO 2004/037272 A1

明 細 書

デング熱ウィルス感染阻害剤

5 技術分野

この出願の発明は、デング熱ウィルス感染阻害剤に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、少なくともパラグロボシド糖鎖等のオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有するデング熱ウィルス感染阻害剤に関するものである。

背景技術

デング熱 (dengue fever) は、デングウィルス (dengue virus) の急性感染症で、その臨床的特徴から、予後良好な古典的デング熱 (classical dengue fever: CDF)、出血傾向を示すデング出血熱 (dengue hemorrhagic syndrome: DHF)、最も重篤でショックを特徴とするデングショック症候群 (dengue shock syndrome: DSS) に分類される(平林義弘, 「感染症症候群 I 領域別症候群シリーズNo. 23」, 1999年, p. 145-149)。

CDFは、3～9日の潜伏期間の後、40℃前後の発熱、頭痛、腰背部痛、顔面紅潮、結膜充血などを突然発症し、全身の激しい関節痛と筋肉痛を伴う疾患である (Sabin, A. B., American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1952, Vol. 2, p. 30-50)。また、やや遅れて、消化器症状や上気道炎症も出現する。しかし、これらの症状は、自己限定的であり、自然経過で治癒・回復する。一方、DHF/DSSもCDFとほぼ同様に発症するが、2～6日で出血傾向

もしくはショック様症状が著明となり、虚脱感や全身衰弱が激しく、状態が急速に悪化する点で異なる (Cohen, S. N. et al., Journal of Pediatrics, 1966, Vol. 68, p. 448-456; Nimmannitya, S. et al., American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 5 1969, p. 954-971)。

デング熱の病原体であるデングウィルスは、直径約40～60 nmでエンベロープを有し、約11 kbのプラス極性の1本鎖RNAを有し、ウィルス学的には黄熱ウィルスや日本脳炎ウィルスなどとともにフラビウィルス科 (Flaviviridae) に属する。また、デング
10 ウィルスは、感染中和抗体の交叉性に基づいて1～4型の4種の血清型に分類されることが知られている (Westaway, E. G. et al., Intervirology, 1985, Vol. 24, p. 183-192; Chambers, T. J. et al. Annual Reviews Microbiology, 1990, Vol. 44, p. 649-688)。

自然界におけるデングウィルスベクターは、シマカ類の蚊であり、中でも熱帯地方に広く生息するネッタイシマカ (Aedes aegypti) が主要な媒介蚊となっている (Bancroft, T. L., Australasian Medical Gazette, 1906, Vol. 25, p. 17-18)。都市部では、ウィルス保有蚊の刺咬によってヒトが感染し、逆にウィルス血症を呈している患者を刺咬して蚊がウィルスを獲得する
20 という蚊-ヒト-蚊の生活環が成立しており、人口のまばらな森林地帯では、蚊とサル類によってサイクルが成立していると考えられている (Gubler, D. J., The Arboviruses: Ecology and Epidemiology Vol. 2, 1988, CRC Press, p. 223-260)。

デング熱は、世界各地の熱帯地方に広く分布しており、感染力
25 が極めて強く、流行時には人口の約80 %が感染することが知られている。地球上の患者は2000万人/年 (WHO) にもおよび、流行地

域も患者数も年毎に拡大の一途をたどっている (Rigau-Perez et al., The Lancet, 1998, Vol. 352, p. 971-977)。また、かつては見られなかった DHF/DSS が、近年各地で多発しており、出血熱の致死率が 40 % 以上と高いことから、この症状は、再興感染症として位置付けられ、その対策は公衆衛生上極めて重要な問題となっている。

しかし、感染における標的組織、感染初期過程の宿主・ウィルス相互作用に関する分子、遺伝子の情報は極めて少なく、デング熱、デング出血熱に有効な薬は未だ知られていないのが実情である。デング熱ワクチンについても、弱毒性ワクチンを始め、不活性ワクチン、サブユニットワクチン、組み換えワクチン、DNA ワクチンなどの開発が進められてはいるものの、有効性や副反応の問題により実用化には達していない (Chambers, T. J. et al., Vaccine, 1997, Vol. 15, p. 1494-1502)。

一方、ヒトゲノム計画等により、ゲノムの解析によって膨大な遺伝子情報が明らかにされている。そして、遺伝子の機能を解析、解明していくことがこの分野の新たな課題となっている。そして、遺伝子の機能解明のために、遺伝子発現の研究がますます注目されている。

例えば、これまでに、リバビリン (Ribavirin) が毒性 RNA ウィルス感染に対して効能を示すことが報告され、デング熱ウィルスに対する有効な薬剤として作用することが期待された (非特許文献 11)。しかし、アカゲザルを用いたデングウィルス感染において、リバビリンは予防効果を示さず、反対に貧血や血小板増加症を誘発したことが報告されている (Canonico, P. G., Antiviral Research, 1985, Suppl. 1, p. 75-81)。また、これまでに細胞表

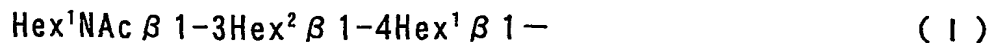
面にあるヘパリン様グリコサミノグリカン、ヘパラン硫酸がデング熱ウィルスの受容体として、その外皮蛋白質と結合することが明らかにされ、この結合を阻害する物質がデング熱ウィルスの感染の治療薬として有望視されている(Marks, R. M. et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2001, Vol. 44, No. 13, p. 2178-2187)。
5
しかし、この分子のみではデング熱ウィルスの宿主特異性を説明することができないことから、他のレセプター構成分子が存在することが予想されている。

さらに、デング熱は、ウィルス抗体により感染が助長される例
10
が多く報告されており、抗原・抗体複合体、Fcレセプターの関与なども考えられているが、詳細な機構については不明である
(Schlesinger, J. J. et al., Virology, 1999, Vol. 260, p. 84-88; Wang, S. et al., Virology, 1995, Vol. 213, p. 254-257)。デング熱ウィルスの受容体研究の多くは、宿主固体、細胞レベルで
15
行われているが、未だ分子、遺伝子レベルでは解明されていない。
デング熱ウィルスのヒトにおける標的細胞は、血球系に存在していると予想されているが(例えばChen, Y. C et al., Journal of Virology, 1999, Vol. 73, p. 2650-2657)、受容体分子は未同定である。

20
そこで、この出願の発明は、以上のとおりの問題点を解決し、デング熱ウィルスの感染を効果的に阻害する薬剤を提供することを課題としている。

発明の開示

25
この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、まず第1には、少なくとも、次式(1)



(ただし、Hex¹およびHex²はヘキソースを表す)

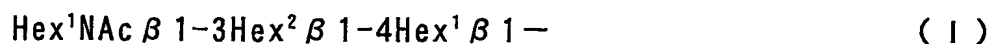
で表されるオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻

5 害剤を提供する。

この出願の発明は、第2には、少なくとも、次式(II)



(ただし、Xは、次式(1)



10 (Hex¹およびHex²はヘキソースを表す)

で表されるオリゴ糖鎖を表し；Rは水素原子、S、N、O、P原子を有する置換基、炭化水素基、脂質、タンパク質、および合成高分子からなる群より選択される基質であり、いずれの場合にも置換基を有してよく；nはRに結合するオリゴ糖鎖の数を表

15 す1以上の数である)

で表される分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤を提供する。

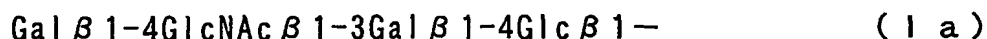
さらに、第3には、この出願の発明は、式(1)で表されるオリゴ糖鎖の非還元末端に、Hex³で表されるヘキソースまたは
20 Hex³NAcで表されるアミノヘキソースのいずれかがβ1-4結合している前記いずれかのデング熱ウィルス感染阻害剤を提供する。

この出願の発明は、第4には、式(1)で表されるオリゴ糖鎖におけるHex¹がグルコース(Glc)であり、Hex²がガラクトース(Gal)またはマンノース(Man)である前記いずれかのデング熱
25 ウィルス感染阻害剤を提供する。

また、この出願の発明は、第5には、式(1)で表されるオリ

ゴ糖鎖におけるHex¹がグルコース (Glc) であり、Hex²がガラクトース (Gal) またはマンノース (Man) であり、Hex³がガラクトース (Gal) またはN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) であるデング熱ウィルス感染阻害剤を提供する。

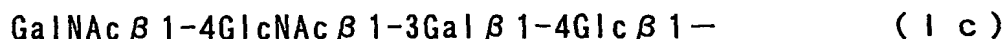
- 5 さらに、この出願の発明は、第6には、式(1)で表されるオリゴ糖鎖が



で表されるパラグロボシドであるデング熱ウィルス感染阻害剤を、第7には、式(1)で表されるオリゴ糖鎖が

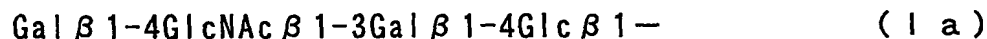
- 10 $\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Man } \beta 1-4\text{Glc } \beta 1- \quad (1b)$

であるデング熱ウィルス感染阻害剤を、そして第8には、式(1)で表されるオリゴ糖鎖が

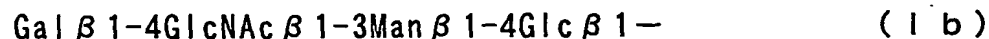


であるデング熱ウィルス感染阻害剤を提供する。

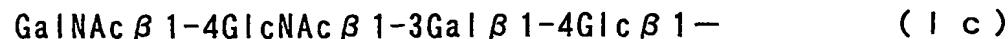
- 15 この出願の発明は、第9には、次式(1a)



で表されるパラグロボシドに対するモノクローナル抗体を、第10には、次式(1b)



- 20 で表されるオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体を、そして第11には、次式(1c)



で表されるオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体を提供する。

- そして、この出願の発明は、第12には、少なくとも前記いずれかのモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤を提供する。
- 25

図面の簡単な説明

図 1 は、この出願の発明の実施例において、phospholipase C 処理後のK562細胞の中性等脂質画分のTLC分析およびvirus結合性の結果を示した写真である。(a:Dittmer試薬噴霧、b:Orcinol試薬噴霧、c:virus-binding assay; 1:中性糖脂質画分(未処理)、2:中性糖脂質画分(phospholipase C (+))、3:中性糖脂質画分(phospholipase C (-))、4:phosphatidylcholine(phospholipase C (+))、5:phosphatidylcholine(phospholipase C (-)); 展開溶媒:CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.); 使用プレート:Polygram Sil G)。

図 2 は、この出願の発明の実施例において、K562細胞の中性糖脂質画分I~IVに対するvirus結合性の結果を示した写真である。

(a:Orcinol試薬噴霧、b:virus (-)、c:virus (+); 1:中性糖脂質画分I、2:中性糖脂質画分II、3:中性糖脂質画分III、4:中性糖脂質画分IV、5:LacCer、6:CTH、7:paragloboside、8:GA₁、9:globoside; 展開溶媒:CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.); 使用プレート:Polygram Sil G)

図 3 は、この出願の発明の実施例において、K562細胞の中性糖脂質画分II-2に対するvirus結合性の結果を示した写真である。

(a:Orcinol試薬噴霧、b:virus (+); 1:中性糖脂質画分II-2、2:phosphatidylinositol、3:paragloboside、4:globoside; 展開溶媒:CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.); 使用プレート:Polygram Sil G)

図 4 は、この出願の発明の実施例において、抗PGモノクローナル抗体(H11)によるK562細胞精製糖脂質画分の免疫化学的検出の

結果を示した写真である。(1 : paragloboside、2 : 中性糖脂質画分 11-2 ; 展開溶媒 : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (50/40/10, by vol.) ; 使用プレート : Polygram Sil G)

図 5 は、この出願の発明の実施例において、パラグロボシドによる Dengue ウィルスの K562 細胞への結合阻害効果の解析結果を示した図である。(a : virus (+)、b : virus (-)、c : paragloboside 100 μM 、d : paragloboside 200 μM 、e : paragloboside 500 μM 、f : GA_1 500 μM)

図 6 は、この出願の発明の実施例において、パラグロボシドによる Dengue ウィルスの K562 細胞への結合阻害効果の解析結果を示した写真である。(a : virus (+)、b : virus (-)、c : paragloboside 100 μM 、d : paragloboside 200 μM 、e : paragloboside 500 μM 、f : GA_1 500 μM)

図 7 は、この出願の発明の実施例において、蚊由来 C6/36 細胞から得られた中性糖脂質画分から Dengue ウィルス結合脂質を単離する際の溶出パターンを TLC で分析した結果を示した写真である。

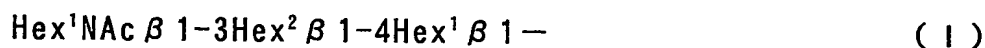
図 8 は、この出願の発明の実施例において、蚊由来 C6/36 細胞から得られた糖脂質と Dengue ウィルスとの結合性の解析結果を示した図である。(1 : C6/36 細胞から抽出した中性糖脂質画分、2 : 1 より精製した Fraction 13 および 14、3 : 1 より精製した Fraction 15)

図 9 は、この出願の発明の実施例において、パラグロボシド糖鎖による Dengue ウィルスの K562 細胞への感染阻害を解析した結果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明者らは、デング熱を引き起こすデング熱ウィルスの宿主がヒトと蚊に限定されているという点に注目し、この2種の生物が共通して有する受容体分子を突き止めるべく鋭意研究を進めた。そして、ウィルスが感染・増殖できる培養細胞（K562細胞：ヒト骨髓性白血病細胞株、およびC6/36細胞：*Aedes albopictus*由来）を用いて、受容体が脂質である可能性、タンパク質である可能性、これらの糖鎖付加体である可能性について、生化学的、免疫学的、細胞生物学的手法により検討したところ、
5
10 デング熱ウィルスのレセプターの検索と同定に成功し、本願発明に至ったものである。

すなわち、この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、次式（1）



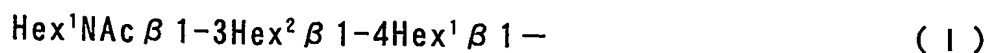
15 で表されるオリゴ糖を必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有するものである。このような糖質分子は、多糖類に限定されず、糖脂質や糖タンパクであってもよい。

また、このような糖質分子において、Hex¹およびHex²はヘキソースを表し、具体的には、グルコース（Glc）、フルクトース（Fru）、
20 ガラクトース（Gal）、マンノース（Man）が例示される。中でも、Hex¹としては、Glcが好ましく、Hex²としては、GalまたはManが好ましい。

この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、また、有効成分として、上記のオリゴ糖部位が、例えば炭化水素基、合成高
25 分子、脂質、タンパク質等の合成化合物や天然化合物に結合した物質、すなわち、



(ただし、Xは、次式 (I))



(Hex¹およびHex²はヘキソースを表す)

- 5 で表されるオリゴ糖鎖を表し；Rは水素原子、S、N、O、P原子を有する置換基、炭化水素基、脂質、タンパク質、および合成高分子からなる群より選択される基質であり、いずれの場合にも置換基を有してよく；nはRに結合するオリゴ糖の数を表す1以上の整数である）で表される物質を有効成分として含有するものであってもよい。

- このとき、Hex¹およびHex²としては、前記のと通りのヘキソースが例示される。また、Rとしては、H、置換基を有していてもよいC₁₋₂₀アシル基、置換基を有していてもよいC₁₋₂₀アルキル基、ラクチル基、アミノ基、ヒドロキシル基、硫酸基、リン酸基等の置換基や、ポリエチレングリコール、ポリグルタミン酸等の高分子鎖、デンドリマー、ポリペプチド、あるいはグリセリン、セラミド等の脂質、アルブミン、フェツイン、トランスフェリン等の血清糖タンパク質、DNAなどが好ましく例示される。中でも、ヒトに対する毒性が低いグリセリン、セラミド等の脂質、あるいは血清糖タンパク質をRとして用いることにより、安定で扱いの容易なデング熱ウィルス感染阻害剤の有効成分を得ることができる。なお、RはβGluのC1位に結合していればよく、Rのどの位置で、どのような形態でβGluのC1炭素と結合していてもよい。

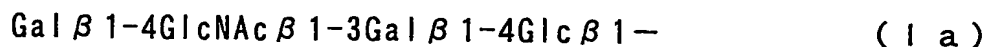
- 上記式 (II) の物質は、例えば、Kitov et al. やNishikawa et al. の報告にあるような、一つのRに対して複数 (n個) のオリゴ糖鎖が結合した構造を有するものであってもよい (Kitov, P. I. et

al., Nature 2000, Vol. 403, p. 669-672; Nishikawa K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 1999, p. 7669-7674)。

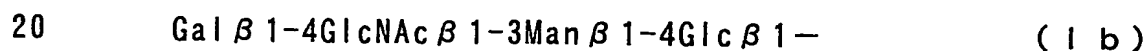
さらに、本発明者らの研究によれば、式(1)で表されるオリゴ糖鎖の非還元末端に、Hex³で表されるヘキソースまたはHex³NAc
5 で表されるアミノヘキソースのいずれかがβ1-4結合しているとき、オリゴ糖鎖がとくに高いデングウィルス結合性を示し、デング熱ウィルス感染阻害剤の効果が高まることが明らかになっている。したがって、式(1)で表されるオリゴ糖鎖は

Hex³ (or Hex³NAc) β1-4Hex¹NAc β1-3Hex² β1-4Hex¹ β1- (1')
10 であることが好ましい。このとき、Hex³としては、グルコース(Glc)、フルクトース(Fru)、ガラクトース(Gal)、マンノース(Man)等が例示される。また、Hex³NAcとしては、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、N-アセチルマンノサミン(ManNAc)等が例示される。中でも、Hex³とし
15 ては、Galが、また、Hex³NAcとしては、GalNAcが好ましい。

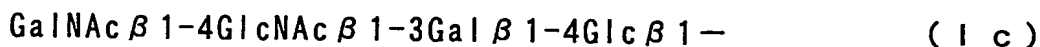
以上のとおりのデング熱ウィルス感染阻害剤において、式(1)で表されるオリゴ糖鎖としてとくに好ましいものを挙げるならば、



で表されるパラグロボシド、



および



で表されるオリゴ糖鎖が例示される。

この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、発明者らにより明らかにされた、デングウィルスが前記の式で表される特定のオリゴ糖鎖を特異的に認識・結合するという性質を利用するも
25

のである。したがって、これらのオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体を公知の生物学的手法により製造すれば、このようなモノクローナル抗体もまた、デング熱ウィルス感染阻害剤の有効成分として作用する。

- 5 また、以上のとおりのデング熱ウィルス感染阻害剤において、有効成分として用いられるオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子やオリゴ糖部位を有する物質、あるいはオリゴ糖に対するモノクローナル抗体以外の成分の組成や、医薬品としての形態はとくに限定されない。オリゴ糖へのデングウィルスの結合を
- 10 阻害しない限り、各種の成分を含有していてもよく、その投与形態もとくに限定されない。具体的には、錠剤、粒・散剤、シロップ剤等の形態での経口投与、注射剤等の形態での非経口投与、座薬等の形態での直腸投与など患者の症状や状態に応じた投与方法を選択することができる。
- 15 この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤を経口投与する場合には、錠剤、トローチ、カプセル、霊薬、粉末、顆粒、懸濁液、乳液、およびシロップ等の形態とすることができる。また、被覆粒子、多層錠剤あるいは微小顆粒等として、緩慢放出または遅延放出される形態としてもよい。これらの形態においては、デ
- 20 ング熱ウィルス感染阻害剤は、オリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子やオリゴ糖鎖部位を有する物質、あるいはオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体とともに、薬学認容性の結合剤、甘味料、崩壊剤、希釈剤、人工香味料、被覆剤、保存剤、潤滑剤および／または効果遅延剤等を含有していてもよい。
- 25 非経口投与では、有効成分であるオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子やオリゴ糖鎖部位を有する物質、あるいはオ

オリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体は、毒性を有さず、非経口的に認容される希釈剤や溶媒、具体的には、無菌の水溶液、または油性溶液、あるいは懸濁液中で調製してもよい。

この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤では、有効成分
5 であるオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子、オリゴ糖鎖部位を有する物質、およびオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体は、座薬等の形態で直腸投与されるものであってもよい。好適な座薬は、活性物質を常温では固体で直腸では融解する非刺激性の賦形剤と混合することによって調製してもよい。

10 この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、さらに、あまり一般的ではないものの、吸入スプレーや軟膏等の経皮投与用形態を有するものであってもよい。例えば、吸入スプレーは、溶液、懸濁液または乳状液とし、二酸化炭素や一酸化二窒素等の低毒性の吸入可能な噴霧剤を含んでもよい。一方、経皮投与用とし
15 ては、クリーム、軟膏、ジェル、ゼリー、チンキ、懸濁液または乳状液の形態が好ましく挙げられる。これらは、薬学認容性の結合剤、希釈剤、崩壊剤、保存剤、潤滑剤、分散剤、懸濁剤および／または乳化剤を含有してもよい。

この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、一般的に知
20 られる各種の方法によって製造されてもよい。例えば、有効成分であるオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子あるいはオリゴ糖鎖部位を有する分子、さらには、オリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体を1種以上の好適なキャリア、補助剤、希釈剤または賦形剤と共にすりつぶす、粉碎する、ブレンドする、分散
25 する、溶解する、懸濁する、混合する、混和する、組合せる、乳化する、またはホモジネートすることによって調製される。また

これらのステップを1以上組合せて製造されるものであってもよい。

この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤において、有効成分の含有量はとくに限定されない。例えば、有効成分としてのオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子やオリゴ糖鎖部位を有する分子、あるいはオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体の濃度が500～1000 mg/人/日となるように配合することができる。もちろん、患者への投与量は、患者の年齢、性別、体重などを考慮して主治医の診断により患者の症状、状態に応じて決定されるべきものである。好ましくは、患者の体重に応じて10～100 mg/kgの範囲で投与することが望ましい。

以上のとおりのこの出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、デング熱症状の発症を抑制する目的で、デング熱ウィルスに感染した恐れのある患者に対して、感染初期の段階で投与できる。また、この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤を、デング熱症状を示す患者に投与すれば、デング熱の治療も可能となる。さらに、この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、デング熱流行地域の住民や流行地域への渡航者に対して投与することにより、デング熱ウィルスへの感染予防剤としても効果的に作用する。

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細に説明する。もちろん、この出願の発明は、以下の実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。

25 実施例

<実施例1> K562細胞(ヒト骨髓性白血病細胞株)からのDengue

virus結合性脂質の単離・精製

(1) 中性糖脂質の単離・精製

K562細胞 (T-225フラスコ 26本分) に冷PBS (-) 0.5 mlを加え懸濁し、4℃で遠心した。得られたペレットに5 mlの精製水を加えてよく懸濁し、次にCHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を100 ml加え、攪拌しながら1時間、総脂質の抽出を行った。抽出液をろ過し、残渣に対して同じ処理を再度行い、得られたろ液をあわせてナス型フラスコに移し、溶媒を除去した。乾固した総脂質画分にMeOH 30 mlを加え、超音波処理を5分間行った後、10 N NaOH 300 μlを加え37℃で一晩インキュベートした。

反応終了後、1 N AcOH 3 mlを加え、よく懸濁し、超音波処理を5分間行い、再び溶媒を除去した。乾固した総脂質画分に精製水5 mlを加えてよく懸濁し、超音波処理を5分間行った。同じ処理を再度行い、あわせた懸濁液を4℃で一晩透析した。凍結乾燥を行い、これを総脂質画分とした。

得られた総脂質画分をCHCl₃/MeOH/H₂O (30/60/8, by vol.) 5 mlに溶かし、よく懸濁した後、超音波処理を5分間行った。同じ処理を再度行い、あわせた懸濁液を予め同じ溶媒で平衡化したDEAE-Sephadex A-25 (酢酸型、ゲル容積100 ml) カラムにアプライした。ゲル容積の10倍量のCHCl₃/MeOH/H₂O (30/60/8, by vol.) を流し、この画分を集めて中性糖脂質画分とし、溶媒を除去した。

中性糖脂質画分に2 mlのCHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を加え、よく懸濁した。

(a) 中性糖脂質画分のTLC分析

得られた中性糖脂質画分 (5 μl)、phosphatidylethanolamine (PE) (1 μl)、LacCer (Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer) (1 μl)、Ceramide

monohexioside (CMH : Glc β 1-1' Cer) (2μ l)、Ceramide trihexoside (CTH : Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer) (2μ l)、phosphatidylcholine (PC) (2μ l)、phosphatidylserine (PS) (2μ l)、phosphatidylinositol (PI, ウシ肝臓由来, SIGMA社) (2μ l) をHPTLC上にスポットし、一度アセトンで展開し、風乾した後、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (60/35/8, by vol.) で展開し、1枚はOrcinol試薬を噴霧して110℃に加熱し、1枚はDittmer試薬を噴霧し発色を行った。

(b) 中性糖脂質画分の再アルカリ加水分解

10 中性糖脂質画分の溶媒を除去し、MeOH 5 mlを加えてよく懸濁した後、超音波処理を5分間行った。10 N NaOH 50μ lを加え、37℃、3時間インキュベートした。反応終了後、0.1 N AcOH 5 mlを加えて、よく懸濁し、超音波処理を5分間行い、再び溶媒を除去した。これに精製水5 mlを加え、よく懸濁し、超音波処理を5分間行った。同じ処理を再度行い、合わせた懸濁液を4℃で一晩透析し、凍結乾燥した。

(c) phospholipase C処理

中性糖脂質画分にはリン脂質が含まれていると考えられるため、PCが完全に加水分解される条件でphospholipase C処理を行った。

20 まず、中性糖脂質画分 (50μ l) とpositive controlとしてPC (5μ l) をそれぞれ2本の試験管に取り、窒素気流下で蒸発固化し、ether/ethanol (98/2, by vol.) を 100μ lずつ加えた。1分間の超音波処理を行い、各試料の1本の試験管にはCaCl₂含有0.1 M Tris buffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (pH 7.2) で溶解したphospholipase C (Clostridium perfringens由来, SIGMA社) ($0.1 \text{ mg}/100 \mu$ l) 溶液を、残りの1本には、CaCl₂含有0.1 M

Tris buffer (pH 7.2) のみを100 μ lずつ加え、よく懸濁した後、25 $^{\circ}$ Cの水浴にて3時間反応させた。

反応終了後、溶媒を窒素気流下で除去し、生成物を逆相カラムで脱塩した。脱塩画分を窒素気流下で蒸発固化し、CHCl₃/MeOH(1/1, 5 by vol.) を、中性糖脂質画分には30 μ l、PCには15 μ l加え、よく懸濁した後、TLCプレート (Polygram Si1 G) 上にスポットした。TLCプレートを一度アセトンで展開し、風乾した後、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.) で展開し、1枚はOrcinol試薬を噴霧して110 $^{\circ}$ Cに加熱し、1枚はDittmer試薬を噴霧し発色を行っ
10 た。

また、virus-binding assayを行った。

図1に結果を示した。Phospholipase C処理によるvirus結合性の変化は認められなかった。Phospholipase C処理後においても、まだPC以外のリン脂質のバンドがいくつか観察されたことから、
15 イアトロビーズカラムを用いて中性糖脂質画分をさらに4つの画分に精製した。

中性糖脂質画分全量をphospholipase C処理し、反応液全量を4 $^{\circ}$ Cで一晩透析することで脱塩を行った。乾燥標品に対し、CHCl₃/MeOH (8/2, by vol.) を1 ml加え、懸濁し、超音波処理を5分間行っ
20 た後、これをイアトロビーズカラムにかけ、①CHCl₃/MeOH(8/2, by vol.)、②CHCl₃/MeOH/H₂O (65/25/4, by vol.)、③CHCl₃/MeOH/H₂O (60/35/8, by vol.)、④CHCl₃/MeOH/H₂O (50/40/10, by vol.) の4種の溶媒で連続して溶出し、中性糖脂質画分をさらに4つの画分に分けた。(各々、中性糖脂質画分I~IVとした。)

25 これらを窒素気流下で蒸発固化し、それぞれに1 mlのCHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を加え、うち5 μ lずつをTLCプレート

(Polygram Sil G) にスポットした。プレートをアセトンでもう一度展開し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (50/40/10, by vol.) で展開し、Orcinol試薬、Dittmer試薬を噴霧し発色した。

(d) 中性糖脂質画分 I ~ IV の化学分析および virus 結合性の検討

5 前記 (c) で得られた中性糖脂質画分 I ~ IV ($10 \mu\text{l}$ ずつ)、対照標品として、LacCer ($1 \mu\text{l}$)、CTH ($2 \mu\text{l}$)、paragloboside (PG: Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer) ($2 \mu\text{l}$)、GA₁ (Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer) ($2 \mu\text{l}$)、globoside (GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer) ($2 \mu\text{l}$) を TLC プレート (Polygram Sil G) にスポットし、アセトンで一度展開した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (50/40/10, by vol.) で展開し、Orcinol 試薬を噴霧して 110°C に加熱し、発色した。中性糖脂質画分 I ~ IV

10 について、前記の方法により TLC/virus-binding assay を行った。結果を図 2 に示した。

15 図 2 より、中性糖脂質画分 I ~ IV のうち、中性糖脂質画分 II は virus と強い結合性を示し、CTH、PG 及び globoside と呼ばれる中性糖脂質と非常に近い分子構造を有していることが示唆された。

(e) TLC プレートからの目的糖脂質のかきとり・抽出

そこで、virus との結合性を示す部分を TLC プレートからかきとり、抽出を行い、目的物質を含む中性糖脂質画分を得た。

20

TLC プレート (Polygram Sil G) を前処理として $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/40/10, by vol.) で展開、風乾しておいた。中性糖脂質画分 II を窒素気流下で蒸発固化し、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1, by vol.) を 0.1 ml 加え、その全量を $1 \mu\text{l}/\text{mm lane}$ となるようにプレート上にスポットし、アセトンで一度展開後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM MgCl}_2$ (50/40/10, by vol.) で展開した。

25

TLCの両端を切り取り、Orcinol試薬を噴霧して110℃に加熱し、発色させた後、目的糖脂質のバンドを確認した。

残ったプレート上のバンドに対応する部分をはさみで切り取り、切り取ったTLCプレートからシリカゲルをかきとり、これに
5 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (30/60/8, by vol.) を25 ml加え、1時間攪拌し、抽出を行った。抽出液を綿栓ろ過し、ろ液から溶媒を除去した。これに $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8/2, by vol.) 1 mlを加え、超音波処理を行い、パスツールピペットに詰めたイアトロビーズカラム（ゲル容量1 ml）にアプライした。

10 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8/2, by vol.) を15 mlカラムに流し、この画分を集めた。（中性糖脂質画分II-1）

次に、溶出溶媒を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (30/60/8, by vol.) に変え、20 mlカラムに流した。（中性糖脂質画分II-2）

それぞれの画分から溶媒を除去した後、0.5 mlの $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$
15 (1/1, by vol.) を加えた。5 μl ずつTLCプレートにスポットし、アセトンで一度展開した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{ mM MgCl}_2$ (50/40/10, by vol.) で展開し、Orcinol試薬を噴霧して110℃に加熱発色した。このとき対照標品として、PG、globoside、CTHも2 μl ずつTLC上にスポットした。

20 (2) 中性糖脂質画分に対するvirus結合性の解析

前記(1)の方法により得られた中性糖脂質画分II-2(10 μl)、PI(10 μl)、PG(2 μl)、globoside(1 μl)をTLCプレート(Polygram Sil G)にスポットし、アセトンで一度展開した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12\text{ mM MgCl}_2$ (50/40/10, by vol.) で展開し、Orcinol試薬を噴霧し
25 て110℃に加熱し、発色させた。TLC/virus-binding assayを前記の方法により行った。

結果を図 3 に示した。

図 3 より、中性糖脂質画分 11-2 には、TLC 上で PG と非常に近い位置に展開される糖脂質が含まれていること、さらにはこの糖脂質が Dengue virus と強い結合性を示すことが確認された。また、対
5 照標品である PG に対しても、同様の virus 結合性が観察された。

(3) 中性糖脂質画分に含まれる結合性脂質の構造解析

以上より、Dengue virus と結合性を示す糖鎖分子が PG と非常に近い糖鎖構造をしていることが示唆された。そこで、抗 PG モノクローナル抗体を用いて免疫化学分析を行った。

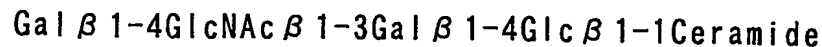
10 (a) 免疫化学的分析

中性糖脂質画分 11-2 (10 μ l) および PG (2 μ l) を TLC プレート (Polygram Sil G) にスポットし、アセトン、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/12 \text{ mM}$ MgCl_2 (50/40/10, by vol.) で連続的に展開した。TLC プレートを 1% BSA-PBS (bovine serum albumin-phosphate buffered saline) 溶液中にて 4°C で一晩ブロッキングした。1% BSA 含有 PBS で 5000 倍
15 希釈した抗 PG モノクローナル抗体 (クローン H11) (5 ml) と 1 時間反応させた後、0.05% Tween 20 を含む PBS (10 ml) で 3 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した。洗浄終了後、1% BSA 含有 PBS で 5000 倍希釈した HRP (horseradish peroxidase) 標識ヤギ抗マウス
20 IgG+IgM (5 ml) (American Qualex Antibodies 社) と 1 時間反応させた。プレートを PBS (-) で 3 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した。最後に発色基質溶液 [0.1 M citrate buffer pH 6.0 (5 ml), 0.11 M 4-chloro-1-naphthol in CH_3CN (100 μ l), 0.06 M DEPDA in CH_3CN (100 μ l), 30 % H_2O_2 (10 μ l)] と反応させ、スポットを検
25 出した。

結果を図 4 に示した。

図 4 より、中性糖脂質画分 11-2 には、PG と同一の糖脂質が含まれていることが判明した。

以上より、K562 細胞中の Dengue ウィルス結合性脂質は、次式



- 5 (ただし Gal: Galactose、GlcNAc: N-acetylglucosamine、Glc: glucose) で表されるパラグロボシド (PG) 糖鎖構造を有する中性糖脂質であることが確認された。

<実施例 2> Flow cytometer を用いた PG による Dengue virus の K562 細胞表面への結合阻害効果の解析

- 10 K562 細胞をコンフルエントまで培養した後、 2×10^5 cells/0.1 ml になるようにマイクロチューブに分取した。これを 4°C、10,000 rpm で 2 分間遠心後、得られた細胞のペレットを 0.1% BSA 含有 PBS 1 ml で 1 回洗浄した。Dengue virus 液 (2000 units/ml) と PG (0, 100, 200, 500 μ M) あるいは対照糖脂質である GA₁ (500 μ M) を 0.1% BSA 含有 PBS 中で 4°C、1 時間ブレインキュベーションした後、それ
- 15 ぞれ K562 細胞に 100 μ l ずつ加え、4°C で 1 時間、細胞へ結合させた。なお、virus (-) として、0.1% BSA 含有 PBS のみを同量加えた。反応終了後、冷 PBS (-) 1 ml で細胞を 3 回洗浄し、一次抗体としてヒト抗 flavivirus 抗血清 (ロット # 1) を 200 倍希釈して 100 μ l ずつ加
- 20 え、よく懸濁した後 4°C で 30 分間反応させた。冷 PBS (-) 1 ml で細胞を 3 回洗浄し、二次抗体として FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG (Zymed 社) を 50 倍希釈して、100 μ l ずつ加え、遮光した後、4°C で 30 分間反応させた。反応終了後、冷 PBS (-) 1 ml で細胞を 3 回洗浄し、得られたペレットに対して 0.5 ml の冷 PBS (-) を加え、よく懸濁し、
- 25 フローサイトメーター (Epics, U. S. A.) で測定した。

PG による Dengue ウィルスの K562 細胞への結合阻害を調べ、PG 濃

度依存性を図 5 に示した。

図 5 より、PGの濃度に依存してデングウィルスのK562細胞への結合が阻害されることが明らかになった。対照糖脂質であるGA₁は中性の 4 糖である点、さらに分子内の非還元末端にガラクトース残基を有する点から、PGと非常に類似した物性であった。しかし、GA₁は500 μ Mの濃度においてもデングウィルスのK562細胞への結合を阻害できなかった。

以上より、PGは、デングウィルスと特異的に結合し、この特異的結合によりウィルスの宿主細胞表面への吸着が阻害されていることが明らかになった。

<実施例 3> パラグロボシドによるDengue virusのK562細胞表面への結合阻害活性の検討

(1) Dengue virus濃度

K562細胞をコンフルエントまで培養した後、 4×10^5 cells/0.1 mlになるようにマイクロチューブに分取した。これを4℃、3,500 rpmで3分間遠心後、得られた細胞のペレットを0.1% BSA含有PBS 1 mlで1回洗浄した。さらに、4℃、3,500 rpmで3分遠心した後、Dengue virus原液を、それぞれ0.1% BSA含有PBSで希釈して5000 units/ml, 2000 units/ml, 1000 units/ml, 500 units/mlとした後、各々をK562細胞に100 μ lずつ加え、4℃で1時間反応させた。

なお、virus(-)として、0.1% BSA含有PBSのみを同量加えたものを用いた。

反応終了後、冷PBS(-) 1 mlで細胞を3回洗浄し、一次抗体としてヒト抗flavivirus抗血清(ロット#1)を200倍希釈して100 μ lずつ加え、よく懸濁した後4℃で30分間反応させた。冷PBS(-) 1 ml

で細胞を3回洗浄し、二次抗体としてFITC標準ヤギ抗ヒトIgG (Zymed社) を50倍希釈して、100 μ lずつ加え、遮光した後4℃で30分間反応させた。

反応終了後、冷PBS (-) 1 mlで細胞を3回洗浄し、得られたペレットに対して0.5 mlの冷PBS (-) を加え、よく懸濁し、フローサイトメーター (Epics, U. S. A.) で測定した。

以後、virusの濃度は、2000 units/mlとした。

PGによるデングウィルスのK562細胞への結合阻害を調べ、PG濃度依存性を図6に示した。

10 (2) 一次抗体希釈濃度の検討

(1)より、Dengue virus濃度を1000 units/mlに設定し、binding assayを行った。ここでは冷PBS (-) で希釈し、一次抗体の濃度を200倍、400倍、800倍、1600倍とした。なお、virus (-) には200倍希釈した一次抗体を用いた。実験方法は(1)に準じた。

15 以後、一次抗体は、200倍希釈とした。

(3) パラグロボシドによるvirus結合性に与える影響

K562細胞 (1×10^5 cell) を24 well培養用プレートに播種し、RPMI培地で全量1 mlにした。パラグロボシドの最終濃度が0 μ M、100 μ M、200 μ M、500 μ Mになるように希釈して加え、37℃で1時間
20 反応させた。これを低速遠心し、得られたペレットに0.1 % BSA含有冷PBSを1 ml加えた。マイクロチューブに移し替え、(1)の方法によりvirus結合性を評価した。

図6より、デングウィルスとパラグロボシドを予めインキュベートしておくと、パラグロボシドの濃度に依存してデングウィルスのK562細胞への結合阻害が起きることが明確に観察された。
25

また、4糖構造の糖鎖を有する構造類似中性糖脂質であるGA1

(アシアロGM1) ($\text{Gal } \beta 1-3\text{GalNAc } \beta 1-4\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc } \beta 1-1\text{Cer}$) を陰性対照として同様の実験を行ったところ、デングウィルスの細胞表面の結合には全く影響しなかった。

したがって、デングウィルス結合阻害性がパラグロボシド糖鎖
5 構造に特異的な特性であることが確認された。

以上より、K562細胞表面に存在するパラグロボシドは、デング熱ウィルスのレセプターそのもの、あるいはその一部として機能していることが示された。

10 <実施例 4> 蚊由来培養細胞株からの Dengue virus 結合性脂質の単離・精製および同定

(1) C6/36細胞の培養

Dengue virusの標的細胞として、このウィルスに対して感受性を示し、さらに高いウィルス産生能を有する *Aedes albopictus* 由来 C6/36細胞株を用いた。C6/36細胞は、10 %非働化ウシ胎児血清、
15 および 1 %非必須アミノ酸含有 MEM 培地中、28℃で培養した。

細胞株の継代は 1/10 の前培養液に対して、新鮮 MEM 培地を加え、全量 20 ml とし、T-75 フラスコ中に播種した。

(2) 総脂質の抽出

20 15 L 培養液から C6/36細胞をハーベストした。得られた細胞のペレットに $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10/10/1, by vol.) を 1 L 加え、よく懸濁した後、24時間抽出を行った。

これをろ過し、残渣に対して同じ処理を再度行い、得られた上清を合わせてナス型フラスコに移し、溶媒除去した。さらに MeOH
25 を 100 ml 加え、よく懸濁した後、超音波処理を 10 分間行い、10 N NaOH 1 ml を加えて 37℃ で 15 時間インキュベートした。

反応後、10 N AcOH 1 mlを加え、よく懸濁し、超音波処理を5分間行い、再び溶媒を除去した。これに蒸留水20 mlを加え、よく懸濁し、超音波処理を30分間行った。同様の処理を再度行い、合わせた懸濁液を4℃で46時間透析し、凍結乾燥し、これを総脂質画分とした。

(3) イオン交換カラムクロマトグラフィー

得られた総脂質画分にCHCl₃/MeOH/ H₂O (30/60/8, by vol.) 100 mlを加え、よく懸濁した後、超音波処理を10分間行った。これを予め同じ溶媒で平衡化したDEAE-Sephadex A-25 (酢酸型、ゲル容積400 ml) カラムにアプライした。ゲル容積の47.5倍量のCHCl₃/MeOH/ H₂O (30/60/8, by vol.) を流し、この画分を集めて中性糖脂質画分とした。

(4) 中性糖脂質画分の精製

中性糖脂質画分を3 mlのCHCl₃/MeOH (8/2, by vol.) に溶解した。この画分1 mlを同じ溶媒で予め平衡かしたSenshu Pak AQUASIL-SS-3251カラム (8φ×250 mm) を装着したHPLCシステム (PU-2080Plus、日本分光) にインジェクションした。同溶媒 (100 %) から同溶媒:CHCl₃/MeOH/ H₂O (60/35/8, by vol.) (30/70, by vol.) への直線濃度勾配にて総溶媒量100 mlを流し、カラム溶出液を2 mlずつ分取した。各各文をHPTLCに2μlずつスポットし、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (60/35/8, by vol.) でプレートを展開し、Orcinol試薬を噴霧した110℃に加熱し発色を行い、糖脂質の溶出を確認した。

(5) 中性脂質画分とDengue virusとの反応性

3枚のTLCプレート (Polygram Sil G, Marchery Nagel) 上に、中性糖脂質画分を1μlずつスポットし、風乾した後、

nPrOH/H₂O/NH₄OH (75/25/5, by vol.) で展開し、風乾させ、1枚はOrcinol試薬を噴霧して110℃に加熱し発色させた。残り2枚には、PBSを加え、ゆっくり浸透させた後、吸引し、Solution A (1% 卵白アルブミン、1% polyvinylpyrrolidone含有PBS) で室温にて
5 1時間ブロッッキングした。

反応後、virus (+) にはSolution Aを用いて1000 units/mlに調製したDengue virus (D2Th7株) 懸濁液を3 ml加え、virus (-) にはSolution Aのみを同量加えて4℃に一晩静置した。プレートをPBS (-) で3分間、3回洗浄した。

10 次にSolution Aで1000倍に希釈したヒト抗flavivirus抗血清を2.5 ml加えて室温で1時間反応させた。プレートをPBS (-) で3分間、3回洗浄した。最後に2.5 mlの発色基質溶液 (0.1 M citrate buffer pH 6.0 (2.5 ml), 0.11 M 4-chloro-1-naphthol in CH₃CN (50 μl), 0.06 M DEPD in CH₃CN (50 μl), 30 % H₂O₂ (5 μl)) と反応
15 させ、結合したウィルス粒子を検出した。なお、Dengue virus (D2Th7株) およびヒト抗flavivirus抗血清は、長崎大学熱帯医学研究所、五十嵐章教授、森田公一教授よりご恵与いただいた。

(6) 精製糖脂質のTLC分析

単離された中性糖脂質1.5~2 μlずつをHPTLC上にスポットした。

20 nPrOH/H₂O/NH₄OH (75/25/5, by vol.) で展開し、Orcinol試薬を噴霧して110℃に加熱し、発色を行った。

また、各画分を0.5~1 μlずつ3枚のTLCプレート (Polygram Sil G₁) にスポットし、一度アセトンで展開して風乾した後、nPrOH/H₂O/NH₄OH (75/25/5, by vol.) で展開し、風乾させた。1枚は
25 Orcinol試薬を噴霧して110℃に加熱し発色した。残り2枚は、(5)の方法でvirus binding assayを行った。

次に、デングウィルス高感受性細胞株である蚊由来C6/36細胞より、デングウィルス結合脂質の探索を行った。

デングウィルス結合脂質は、K562細胞の場合と同様に陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分画で中性糖脂質画分に溶出された。

この画分から結合性脂質を単離するためにシリカカラムを装着したHPLCを行った。その溶出パターンをTLCで分析した結果を図7に示した。図中矢印で示した2種類の糖脂質が結合性を有していた。今回行ったHPLCの条件でこれら2種類の糖脂質が完全に単離された。

そこで、精製糖脂質とデングウィルスとの結合性を解析した結果を図8に示した。Fraction 13、14および15に含まれていた精製糖脂質が非常に強力にウィルスと結合することが示された。昆虫由来の標準糖脂質との構造比較から、Fraction 13、14に含まれている糖脂質の構造がGlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-1Cer（ただし、Man: mannose; Cer: ceramide）であり、一方、Fraction 15に含まれている糖脂質の構造は、全く新規であり、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-1Cerと推定された。

K562細胞から結合性脂質として単離されたパラグロボシドと、以上の実施例より単離された糖脂質の構造をまとめると、

パラグロボシド	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
Fraction 15	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-1Cer
Fraction 13, 14	GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-1Cer

となった。

したがって、これらの構造から、デングウィルスと結合するために必要な最小糖鎖構造は、GlcNAc β 1-3Man(またはGal) β 1-4Glc

β 1-であり、さらに、非還元末端にGalが β 1-4結合することによりその結合性が高められるものと示唆された。

<実施例 5> パラグロボシド糖鎖によるDengue virusのK562細胞

5 胞への感染阻害活性の検討

以上の実施例において使用されたパラグロボシド糖鎖は、いずれもセラミドに結合した物質であった。

そこで、パラグロボシド糖鎖によるデングウィルスの結合阻害性が、パラグロボシドに対する結合基質に依存せず、セラミド以外
10 外の結合基質でも同様の効果が得られることを確認するために、末端に基質を有さないパラグロボシド糖鎖のみについて、そのウィルス結合阻害性を試験した。

(1) パラグロボシド糖鎖分子および他のオリゴ糖の調製

以下のオリゴ糖を用いた。

- | | | |
|----|------------------------------|---|
| 15 | パラグロボシド糖鎖 | Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc |
| | lacto- <i>N</i> -tetraose | Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc |
| | lactose | Gal β 1-4Glc |
| | N-acetyllactosamine (LAcNAc) | |
| | | Gal β 1-3GlcNAc |

- 20 いずれも、滅菌PBS(-)で1 mMのストック溶液として調製した。
これを適宜希釈して感染阻害実験に使用した。

(2) デングウィルス溶液の調製

- 最終ウィルス量が 3×10^5 FFU (focus forming unit) /sample
となるように0.2 % BSA含有血清非添加RPMI培地 (SF-RPMI) で希
25 釈し、よく攪拌した後、氷上においた。

(3) オリゴ糖によるデングウィルスの前処理

前記（２）で調製したデングウィルス溶液630 μ l（１サンプルあたりのウィルス容量）に対して等量の希釈したオリゴ糖含有溶液を加え、よく攪拌した後、28℃で30分間インキュベートした。これを前処理済みウィルス溶液とした。

- 5 また、陰性対照としてPBS（-）をウィルス溶液と混合したものを
用いた。

（４）ウィルス感染実験

- K562細胞をSF-RPMIで１回洗浄した後、0.1 % BSA-SF-RPMIで1
×10⁶ cells/mlに調製した。この細胞懸濁液を100 μ lずつチュー
10 ブに入れた。これに前処理済みウィルス溶液を加え、軽く攪拌し
た後、37℃で2時間細胞への感染を行った。この間、20分毎にチュ
ーブを軽く攪拌した。3,400 rpmで3分間遠心した後、ウィルス溶
液を除去し、細胞を0.1% BSA-SF-RPMIで3回洗浄した。細胞のペレ
ットに2 %血清含有RPMI培地（2 %FCS-RPMI）を2 ml加え、懸濁し、
15 35 mm dishに移して37℃で培養した。

一定時間培養後に細胞を回収し、ウィルス抗原の検出を行った。

（５）ウィルス抗原の検出（ウィルス感染価の測定）

- 回収した細胞を新しいチューブに移し、PBS（-）で１回洗浄した。
細胞のペレットに4 %paraformaldehyde/PBS（固定液）を200～600
20 μ l加え、4℃で10分間固定操作を行った。

PBS（-）を加えて全量1 mlとした後、2000 rpmで5分間遠心した。
同様の操作をもう１度行った後、細胞をPBS（-）1 mlに懸濁して4℃
で保存した（固定化）。

- 固定化細胞にperm solution（IC PermTM Cell Permeabilization
25 buffer, BIOSOURCE International）を700 μ l加え、ボルテックス
した後、室温に4分間置いた。2500 rpmで3分間遠心した後、perm

solutionをチューブに40 μ l残して上清を除去した。さらに2500 rpmで3分間遠心した後、完全にperm solutionを除去した。細胞のペレットにAlexa標識マウス抗フラビウィルスモノクローナル抗体（クローン6B6C-1）を加え、よく懸濁した後、氷上にて遮光して30分間インキュベートした。2500 rpmで3分間遠心した後、上清を除去し、PBS (-) 1 mlに細胞を懸濁し、氷上に5分間置いた（洗浄）。

同様の操作をさらに2回行い、最後に細胞のペレットに500～1000 mlのPBS (-)を加え、よく懸濁した後、フローサイトメーターで抗原陽性細胞の検出を行った。

結果を図9に示した。結合阻害と同様に、パラグロボシド糖鎖はその濃度に依存してデングウィルスのK562細胞への感染を阻害した。したがって、パラグロボシド糖鎖や昆虫由来の類似糖鎖は、強力なデングウィルス感染阻害剤として効果的であることが示された。さらに、パラグロボシド糖鎖によるデングウィルスの結合阻害性が結合基質に依存しないことも確認された。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明により、デング熱ウィルスへの感染を効果的に防止できるデング熱ウィルス感染阻害剤が提供される。

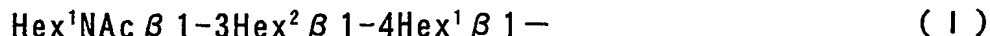
デング熱は第4類感染症に指定されているにも関わらず、これまでその効果的な治療法が確立されておらず、原因微生物であるデングウィルスの宿主への感染機構についても不明な点が多かった。

この出願の発明により、初めてデング熱ウィルス感染阻害剤が

実現したが、これは同時に、デング熱ウィルスへの感染による細胞応答の分子機構の解明や、より効果の高い抗デング熱剤の開発など、さらなる展開への足がかりとしての有用性が高い。

請求の範囲

1. 少なくとも、次式 (I)



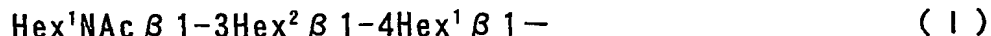
5 (ただし、Hex¹およびHex²はヘキソースを表す)

で表されるオリゴ糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤。

2. 少なくとも、次式 (II)



(ただし、Xは、次式 (I)



(Hex¹およびHex²はヘキソースを表す)

15 で表されるオリゴ糖鎖を表し；Rは水素原子、S、N、O、P原子を有する置換基、炭化水素基、脂質、タンパク質、および合成高分子からなる群より選択される基質であり、いずれの場合にも置換基を有してよく；nはRに結合するオリゴ糖鎖の数を表す1以上の数である)

20 で表される分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤。

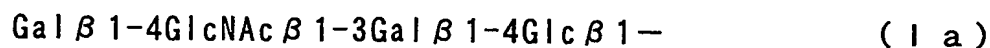
3. 式 (I) で表されるオリゴ糖鎖の非還元末端には、Hex³で表されるヘキソースまたはHex³NAcで表されるアミノヘキソースのいずれかがβ1-4結合している請求項1または2のいずれかのデング熱ウィルス感染阻害剤。

25 4. 式 (I) で表されるオリゴ糖鎖におけるHex¹はグルコース (Glc) であり、Hex²は、ガラクトース (Gal) またはマンノース

(Man)である請求項 1 または 2 のいずれかのデング熱ウィルス感染阻害剤。

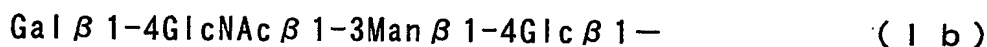
5. 式(1)で表されるオリゴ糖鎖におけるHex¹はグルコース(Glc)であり、Hex²は、ガラクトース(Gal)またはマンノース(Man)であり、Hex³は、ガラクトース(Gal)またはN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)である請求項 3 のデング熱ウィルス感染阻害剤。

6. 式(1)で表されるオリゴ糖鎖は、



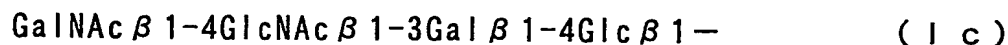
10. で表されるパラグロボシドである請求項 3 のデング熱ウィルス感染阻害剤。

7. 式(1)で表されるオリゴ糖鎖は、



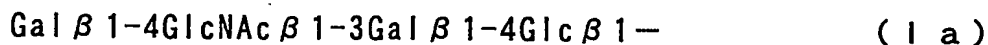
である請求項 3 のデング熱ウィルス感染阻害剤。

15. 8. 式(1)で表されるオリゴ糖鎖は、



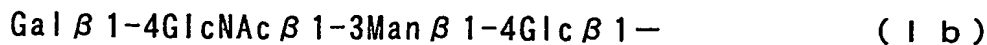
である請求項 3 のデング熱ウィルス感染阻害剤。

9. 次式(1a)



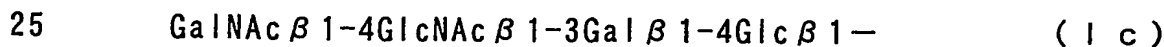
20. で表されるパラグロボシドに対するモノクローナル抗体。

10. 次式(1b)



で表されるオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体。

11. 次式(1c)



25. で表されるオリゴ糖鎖に対するモノクローナル抗体。

12. 少なくとも請求項 9 ないし 11 のいずれかのモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウイルス感染阻害剤。

図 1

BEST AVAILABLE COPY

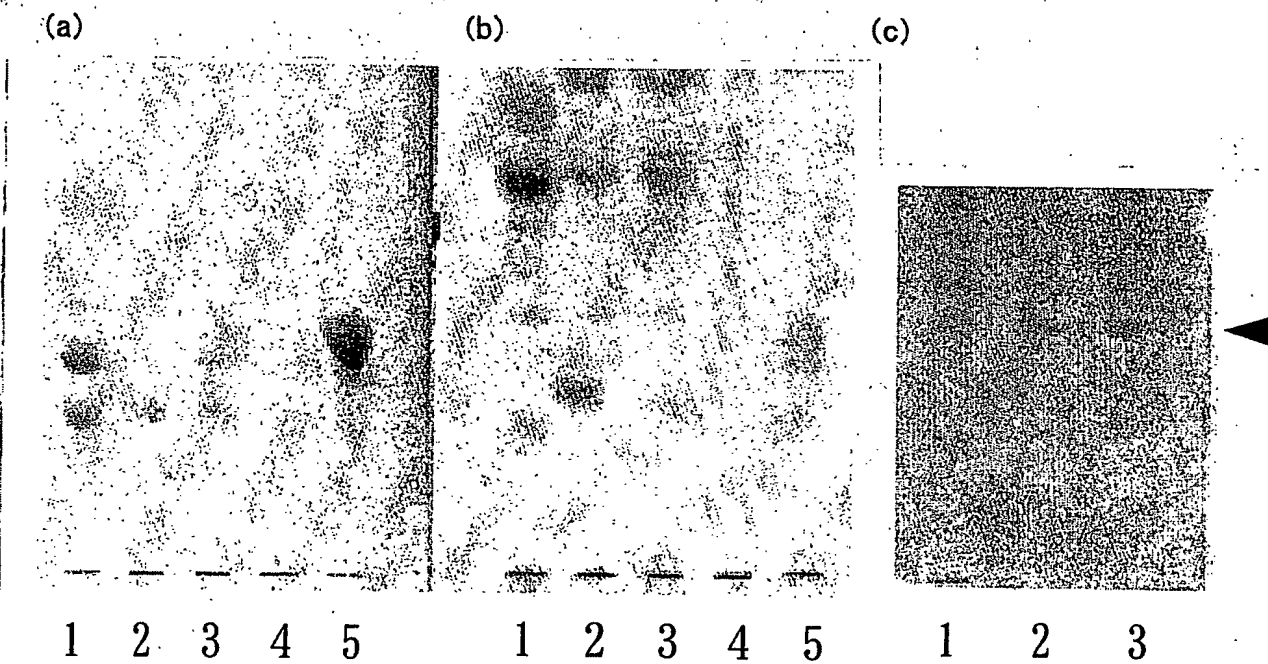


図 2

BEST AVAILABLE COPY

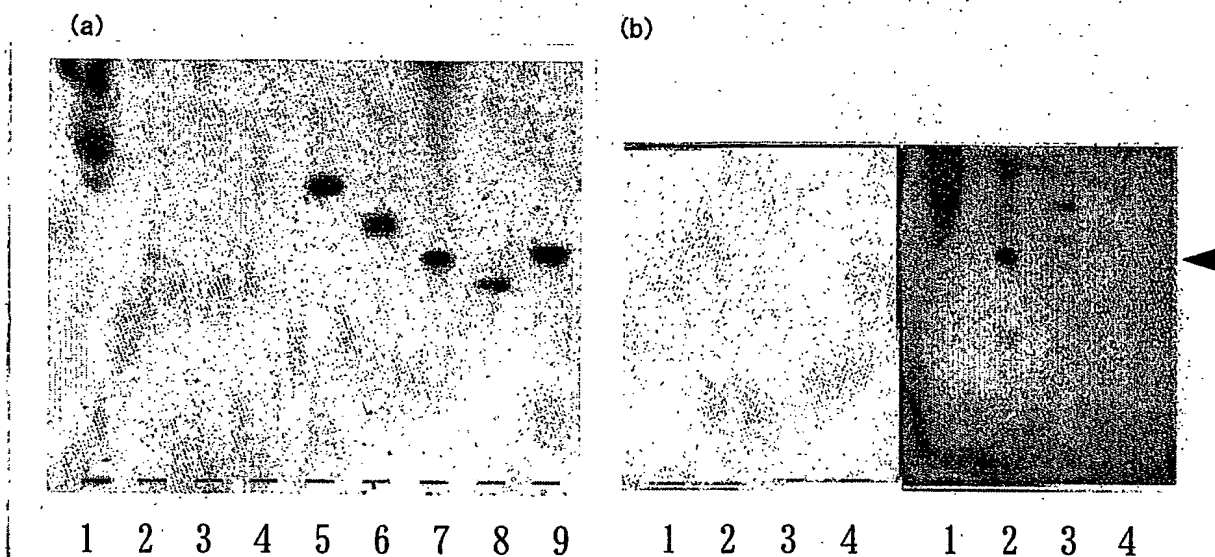


図 3

BEST AVAILABLE COPY

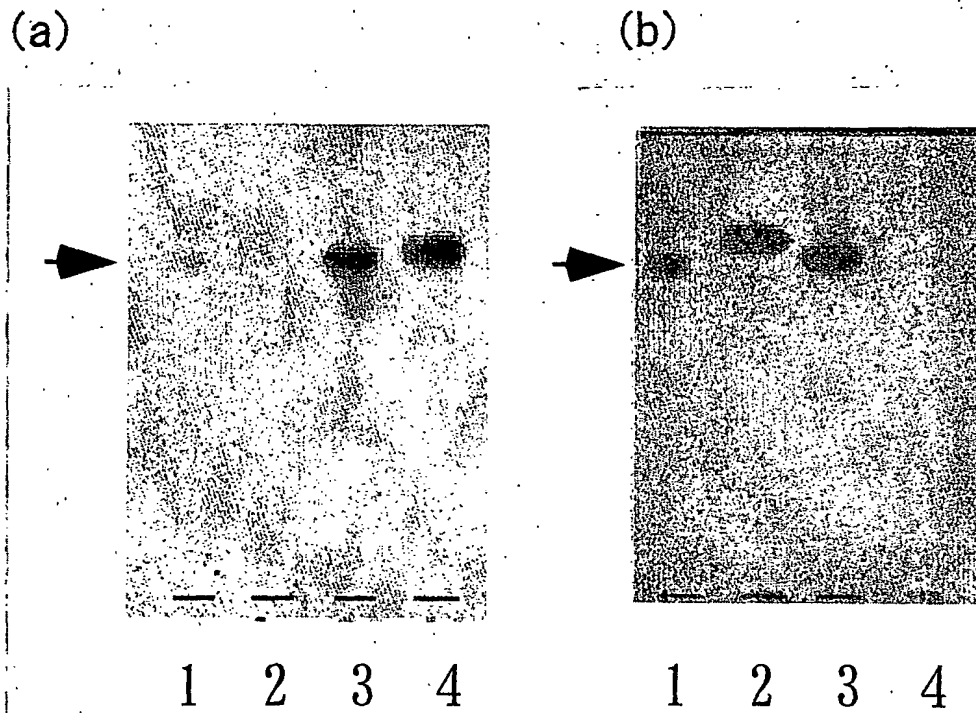


図 4

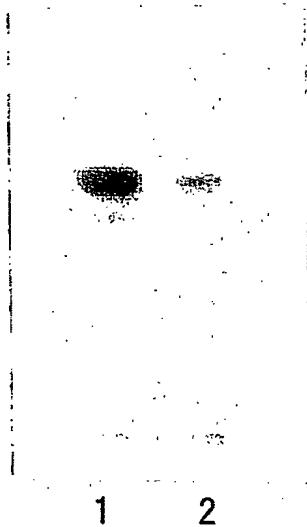


図 5

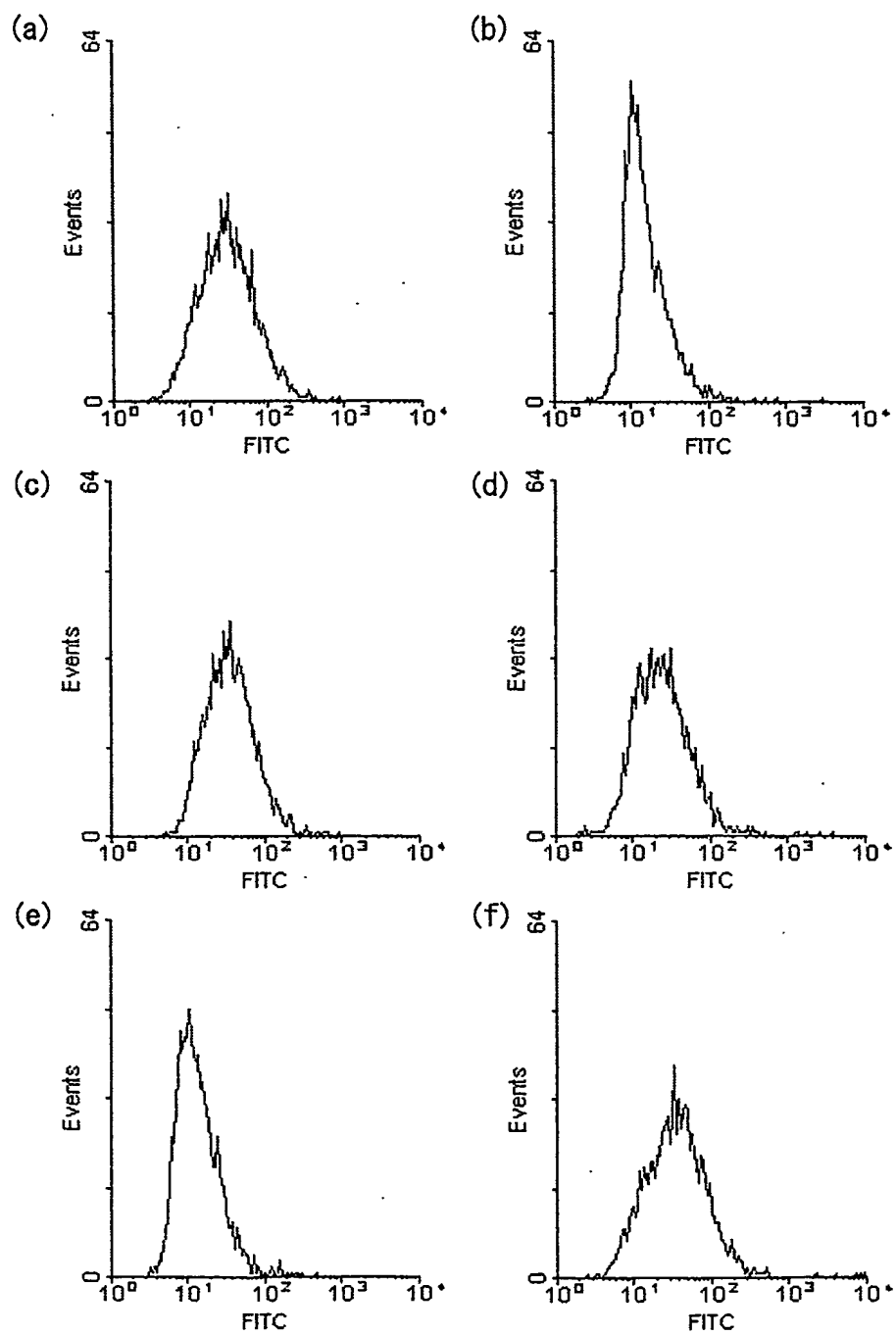


図 6

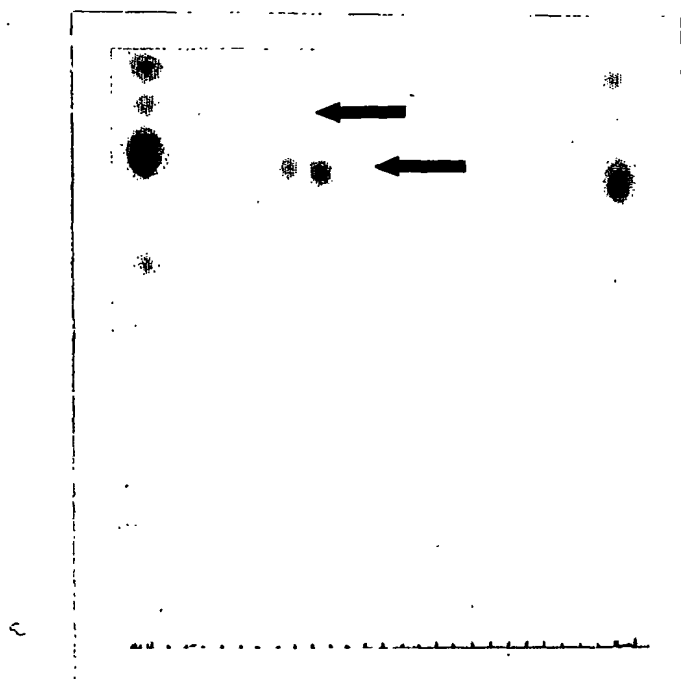


図 7

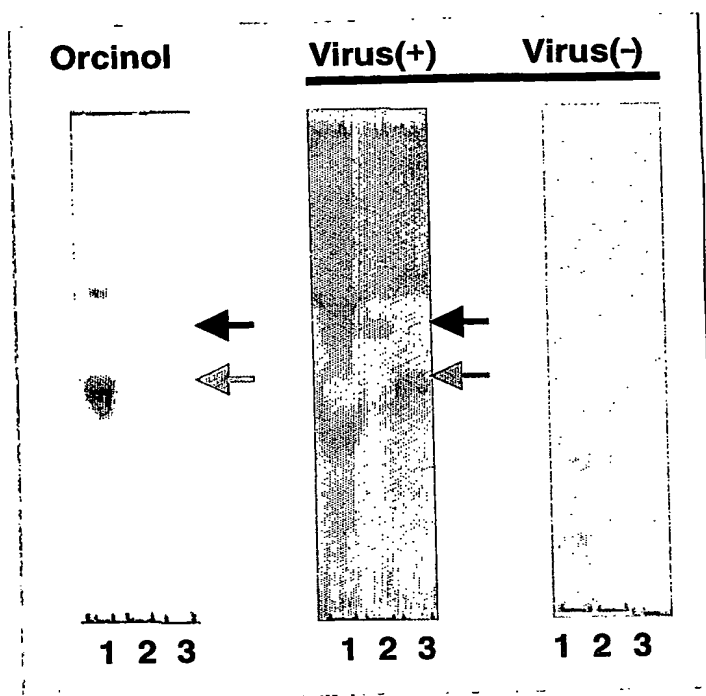
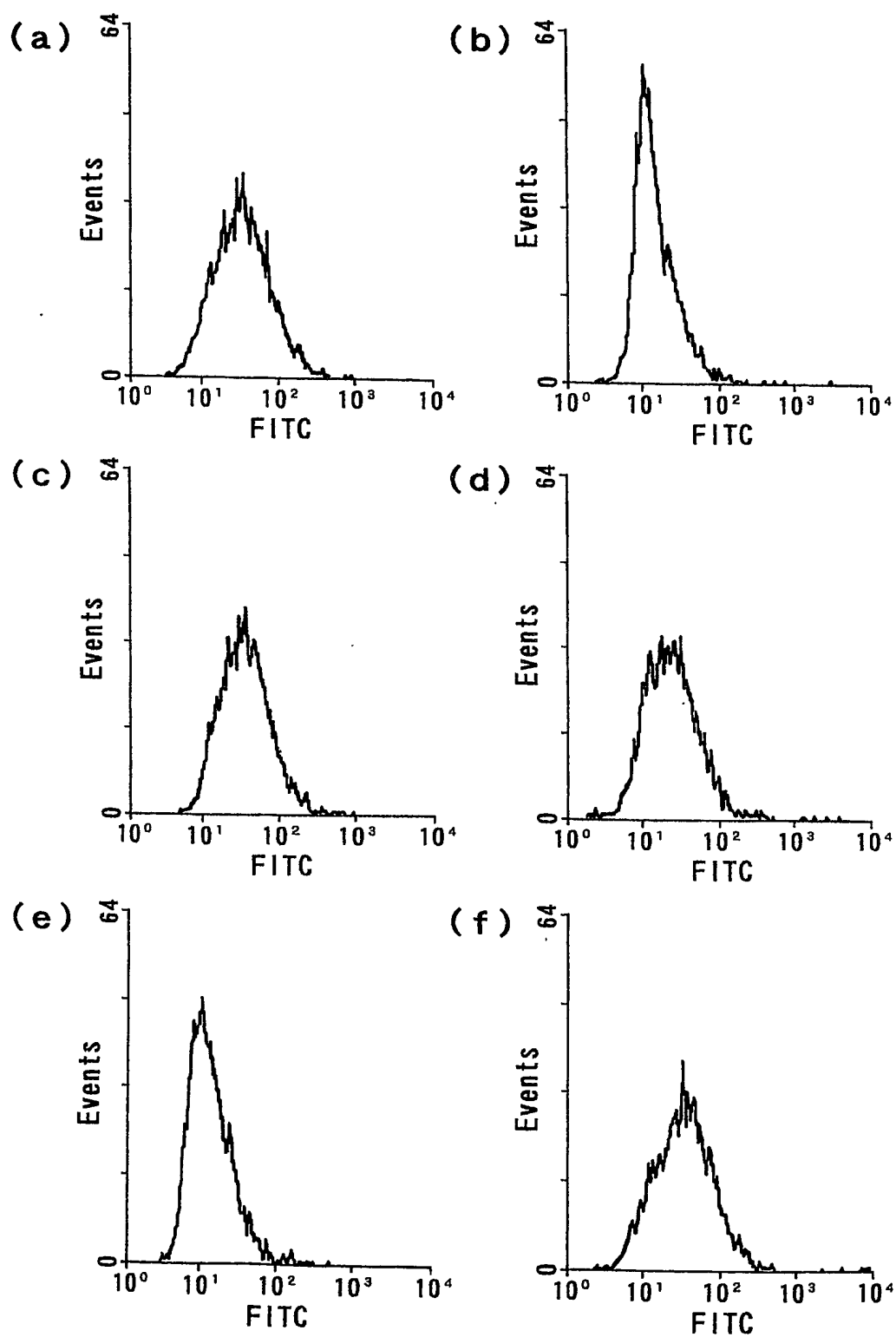


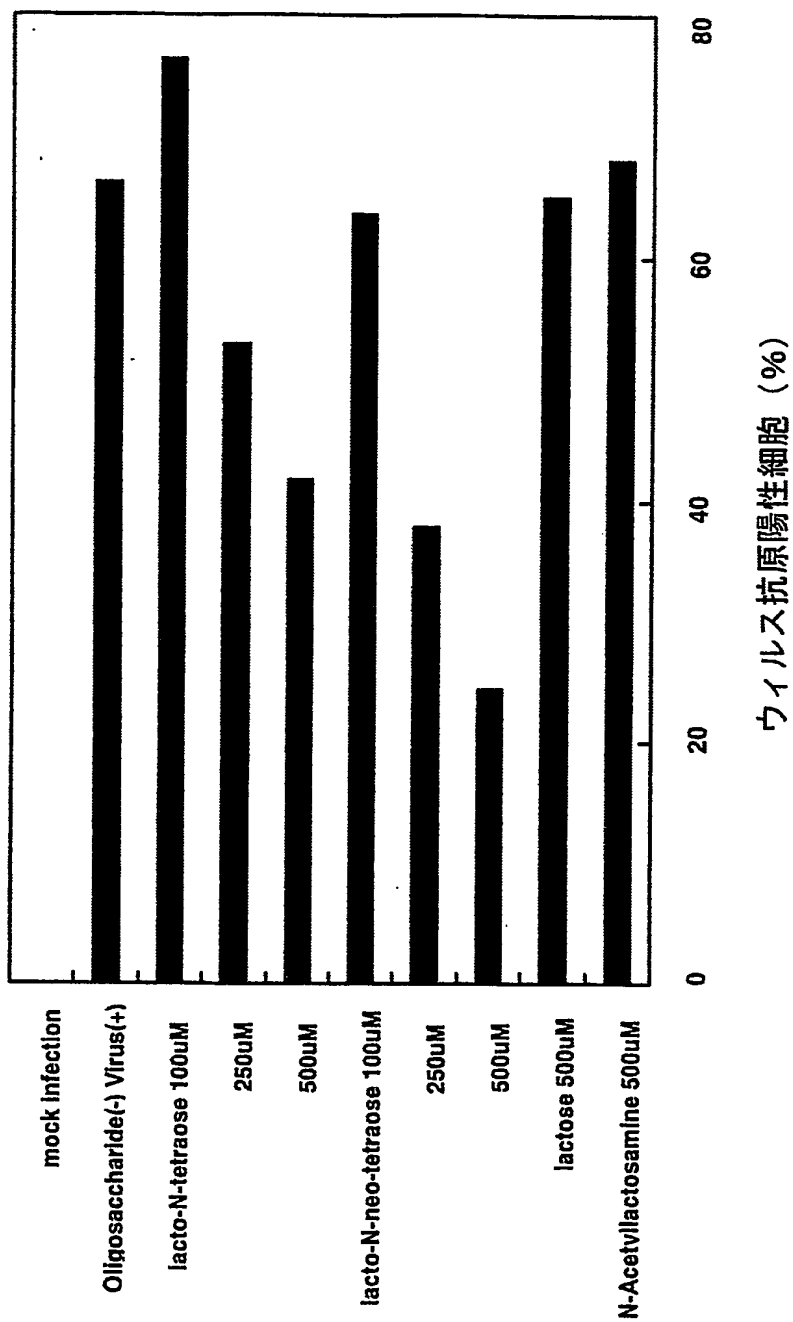
図 8



8/9

図 9

NOT AVAILABLE COPY



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K31/7024, 39/395, C07H15/10 // A61P31/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K31/7024, 39/395, C07H15/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 1-260364 A (Dainabot Co., Ltd.), 17 October, 1989 (17.10.89), (Family: none)	9
X	EP 316764 A (ABBOTT LABORATORIES), 24 May, 1989 (24.05.89), & JP 1-165964 A	9
X	JP 3-115863 A (Dainabot Co., Ltd.), 16 May, 1991 (16.05.91), (Family: none)	9
A	US 4853226 A (CYTOGEN CORP.), 01 August, 1989 (01.08.89), & 87/03206 A & EP 229546 A & JP 63-501980 A	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
28 November, 2003 (28.11.03)

Date of mailing of the international search report
16 December, 2003 (16.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K31/7024, 39/395, C07H15/10 // A61P31/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K31/7024, 39/395, C07H15/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 1-260364 A (ダイナボット株式会社), 1989. 10. 17 (ファミリーなし)	9
X	EP 316764 A (ABBOTT LABORATORIES), 1989. 05. 24 & JP 1-165964 A	9
X	JP 3-115863 A (ダイナボット株式会社), 1991. 05. 16 (ファミリーなし)	9
A	US 4853226 A (CYTOGEN CORPORATION), 1989. 08. 01 & W087/03206 A & EP 229546 A & JP 63-501980 A	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 11. 03

国際調査報告の発送日

16.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘 實 謙二



4P

7433

電話番号 03-3581-1101 内線 3492